

AF

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(3)

(11)Publication number : 2003-014747

(43)Date of publication of application : 15.01.2003

(51)Int.CI.

G01N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
G01N 37/00

(21)Application number : 2001-195573

(71)Applicant : TOYO KOHAN CO LTD

(22)Date of filing : 27.06.2001

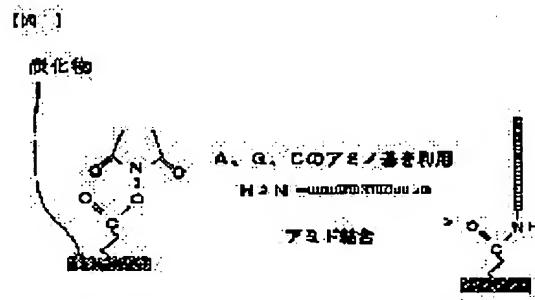
(72)Inventor : NIKA MICHIFUMI
OKAYAMA HIRONAO
OKAMURA HIROSHI
EBARA KEIGO

(54) SOLID SUBSTRATE HAVING FORMED SURFACE TREATMENT LAYER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To solve the conventional problem that a spot comes out and falls down at the time of performing treatment (for example, hybridization) for gene analysis by firmly fixing a bio-substance sample of DNA, a protein, etc., to a substrate by performing covalent coupling.

SOLUTION: A solid substrate which can carry oligonucleotide or a DNA fragment on its surface has a surface treatment layer of a hafnium carbide, niobium carbide, silicon carbide, tantalum carbide, thorium carbide, titanium carbide, uranium carbide, tungsten carbide, zirconium carbide, etc., on its surface. On the surface treatment layer coating the substrate, the oligonucleotide or DNA fragment is carried for gene analysis.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-14747

(P2003-14747A)

(43)公開日 平成15年1月15日 (2003.1.15)

(51)Int.Cl' G01N 33/53

識別記号

FI G01N 33/53

テ-マ-^{コ-1} (参考)
M 4B024
D 4B029

C12M 1/00

C12M 1/00

A

C12N 15/09

G01N 37/00

102

G01N 37/00

C12N 15/00

F

102

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全5頁)

(21)出願番号 特願2001-195573 (P2001-195573)

(71)出願人 390003193

東洋鋼板株式会社

京都府千代田区四条町2番地12

(22)出願日 平成13年6月27日 (2001.6.27)

(72)発明者 丹花 通文

山口県下松市東豊井1298番地の1 東洋鋼
板株式会社技術研究所内

(73)発明者 岡山 浩直

山口県下松市東豊井1298番地の1 東洋鋼
板株式会社技術研究所内

(74)代理人 100100103

弁理士 太田 明男

最終頁に続く

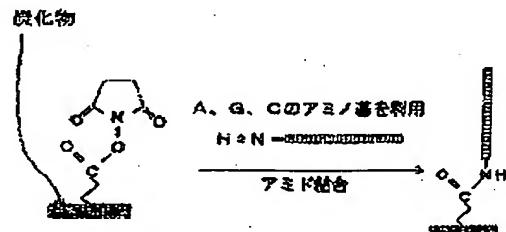
(54)【発明の名称】 表面処理層が形成された固体支持体

(57)【要約】

【課題】 DNAあるいは蛋白質等の生体物質サンプルを基板に共有結合により強固に固定化することにより、従来遺伝子解析のための処理を進める際(例えばハイブリダイスの際)にスポットが抜け落ちるといった問題点を解決すること。

【解決手段】 本発明の固体支持体は、オリゴスクレオチドまたはDNA断片を表面に担持可能な固体支持体において、炭化ハフニウム、炭化ニオブ、炭化硅素、炭化タンタル、炭化トリウム、炭化チタン、炭化ウラン、炭化タンクスチタンまたは炭化ジルコニウム等の表面処理層が形成されていることを特徴とする。この固体支持体の表面処理層の候補上に、オリゴスクレオチドまたはDNA断片を担持させ遺伝子を解析する。

【図1】



BEST AVAILABLE COPY

(2)

特開2003-14747

2

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 固体支持体の表面に、炭化ハフニウム、炭化ニオブ、炭化珪素、炭化タンタル、炭化トリウム、炭化チタン、炭化ウラン、炭化タンクスチル、炭化シリコニウム、炭化モリブデン、炭化クロム、又は炭化バナジウムからなる表面処理層が形成された固体支持体。

【請求項2】 前記表面処理層の厚みが、1nm～100nmである請求項1に記載の固体支持体。

【請求項3】 前記表面処理層の被膜上に、オリゴヌクレオチドまたはDNA断片を担持させた請求項1又は2に記載の固体支持体。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の固体支持体の表面に遺伝子を担持させて遺伝子あるいは蛋白質等の生体物質を解析する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子解析、診断、治療等に使用される遺伝子あるいは蛋白質等の生体物質解析用等に用いられる固体支持体及び該固体支持体を用いて遺伝子あるいは蛋白質等の生体物質等を解析する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、遺伝子解析用等に用いられる固体支持体として、ガラスチップの固体支持体であって、表面に1万以上のDNA断片(DNAプローブ)等の遺伝子を載せれるように加工がされているものが広く用いられている。

【0003】 前記のようなチップを用いて例えば、あるDNAサンプルの塩基配列を知りたい場合には、該固体支持体上に、予め塩基配列が解明されており、互いに異なる塩基配列を有する数万本のDNA断片を、位置がわかるように結合させておいたものを用意し、これに蛍光標識したDNAサンプルを流すと、DNA断片は、該固体支持体上につけたDNA断片(プローブ)のうちの相補的な配列を有するプローブとハイブリダイズする。ハイブリダイズ部分は、固体支持体を蛍光測定することによりスポットとして識別でき、DNAサンプル中のDNA断片の配列を解明することができる。このように、遺伝子解析用固体支持体は、あるDNAの塩基配列を簡単に特定することができることから、生体ゲノムの解析、遺伝子発現のモニタリング、ゲノムミスマッチング等の遺伝子解析等に利用されるほか、さらにガン遺伝子の突然変異の検出等遺伝子診断や医薬品の開発等に応用されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 上記遺伝子解析用固体支持体を利用して蛍光標識したDNAサンプルをハイブリダイズして、固体支持体に蛍光照射することによるスポットの解析により判断される。しかし、従来の遺伝子解析用固体支持体は、前記スポットの解析をするにあた

り、ガラスの洗浄等の前処理を行うため、スポットしたDNA断片が洗い流されてしまい、スポットが明瞭に検出できない場合が多かった。本発明は、このような従来の遺伝子解析用固体支持体の有する蛍光検出の不明瞭さという問題点を解決することを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明において、用いる基板はガラス、プラスチック、シリコンなどの固体支持体に表面処理層を形成し、更に、化学修飾を施すことによって、固体支持体を洗浄してもスポットしたDNA断片が洗い流されずに強固に固定化されており、蛍光照射した際に、蛍光スポットが明瞭となることに気が付いた。本発明は係る知見に基づくものである。

【0006】 本発明の固体支持体は、表面に、炭化ハフニウム、炭化ニオブ、炭化珪素、炭化タンタル、炭化トリウム、炭化チタン、炭化ウラン、炭化タンクスチル、炭化シリコニウム、炭化モリブデン、炭化クロム、又は炭化バナジウムからなる表面処理層が形成されてなることを特徴とする。前記表面処理層の被膜の厚みは、1nm～100nmであることが好ましい。さらに、前記表面処理層の被膜上に、化学修飾を施し、オリゴヌクレオチドまたはDNA断片を担持させたものであることが好ましい。また、このような本発明の固体支持体は、請求項1に記載のように、固体支持体の表面に遺伝子を担持させて遺伝子あるいは蛋白質等の生体物質を解析する方法を利用することができる。

【0007】

【発明の実施の形態】 本発明の固体支持体は、ガラス、プラスチック、シリコンなどの固体支持体の表面に適当な表面処理層が形成されたものを用いると、固体支持体の上にDNAサンプルを載せて様々な解析に用いる場合は、遺伝子あるいは蛋白質等の生体物質との親和性等が強固になるので好ましい。

【0008】 固体支持体としてのプラスチックは、公知のプラスチックが使える。例えば、ポリエチレンテレフタレートあるいはポリブチレンテレフタレートなどのポリエチレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリブロビレン樹脂、ABS樹脂、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルベンゼン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂などの熱硬化性あるいは熱可塑性樹脂が適用できる。

【0009】 また、表面処理としては、炭化ハフニウム、炭化ニオブ、炭化珪素、炭化タンタル、炭化トリウム、炭化チタン、炭化ウラン、炭化タンクスチル、炭化シリコニウム、炭化モリブデン、炭化クロム、又は炭化バナジウム等の炭化物を被覆したものが好ましい。さらに、上記炭化物と他の物質との混合体、例えば金属やセラミックス等との混合体、積層体も好ましい。

【0010】 すなわち、炭素は化学的安定性に優れてお

46
50

り、その後の化学修飾やDNAプローブ等を載せる際の反応等に耐えることができる。その理由は、炭化物上に化学修飾を施し、プローブを固定化したときに、炭化物の炭素に対してプローブが図1に示すような結合形態を示し、DNAプローブを固体支持体に強固に固定化させることができるのであると考えられる。また、固定化されたプローブは、図1に示すように固体支持体上に直に林立させることができるので、単位面積あたりの固定化密度を上げることができる。

【0011】本発明の炭化物の表面処理層の厚みは、特に限定するものではないが、1nm～1000nmの厚みがあればよい。1nm未満では、あまりに薄すぎて表面処理層の厚みが均一にはならず、下地の固体支持体が露出してしまう部分が存在するので好ましくない。一方、1000nmを超える被覆は形成中に表面処理層の中に応力が生じ、剥離が生じやすくなるので好ましくない。工業上の生産性からすると、表面処理層の厚みは、10nm～500nmである。さらに好ましくは、30～200nmである。

【0012】固体支持体への炭化物の表面処理層の形成方法は公知の方法で行うことができる。例えば、高周波スパッタ法、直流スパッタ法、アーキイオンプレーティング法、熱CVD法などが挙げられる。

【0013】本発明の固体支持体は、DNAプローブ等の遺伝子あるいは蛋白質等の生体物質を多数載せることができるものである。従って、固体支持体の表面上に複数の微小区分が設けられ、1つの区分に多数のオリゴヌクレオチド断片を担持可能となっているものも好ましく採用される。微小区分のそれそれにおいて、DNAプローブ等の種類を変えることについては特に制限はなく、用途に応じて適宜変化させることができる。

【0014】固体支持体の形状は特に限定されず、例えば、フィルムまたはシートのような平板状のものであってもよく、また円盤状等のものであってもよい。また、固体支持体の厚さ、大きさ等にも特に制限はなく、通常用いられるのと同様の範囲とすることができます。

【0015】固体支持体の基体となるガラスの特性についても特に限定されるものではないが、基体表面に付ける反応性物質との親和性等の種々の特性を考慮して適宜選択できる。なお、このような基体の表面、もしくは裏面に反射層としてTi、Au、Pt、Ni、WC等の单層又はこれらの複合膜を被覆してもよい。反射層の厚みは全体に均一に被覆されなければならないことから、100nm以上が好ましい。更に好ましくは1000nm以上がよい。

【0016】なお、下地の固体支持体の表面は意図的に粗面化されていることも望ましい。このような粗面化表面は基体の表面積が増えて多量のDNAプローブ等を密度を上げて固定させることに好都合であるからである。

【0017】基体表面には、DNAや蛋白質を固定する

ために、更に化学修飾を施す。化学修飾の一例としては、炭化水素基の末端に活性化エステル基が結合した基を、支持体表面にアミド結合を介して固定化することをいう。このような化学修飾によって、DNA、蛋白質、ペプチド結合等の生体物質を基体表面に固定化しやすくなる。その化学修飾は、末端に極性基、例えば、水酸基、カルボキシル基、エポキシ基、アミノ基、チオール基、イソシアネート基等を有する炭化水素基で固体支持体を置換することになる。

【0018】前記炭化水素基としては、炭素数が1～12のもの、中でも1～6のものが好ましい。例えば、琥珀酸、酢酸、プロピオン酸などのモノカルボン酸；シウ酸、マロイン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸などのジカルボン酸；トリメリト酸等の多価カルボン酸が挙げられる。中でも、シウ酸、コハク酸が好ましい。化学修飾方法としては、例えば、塩素ガス中で支持体に紫外線照射して表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化した後、適当な酸クロリドあるいは酸無水物を用いてカルボキシル化する。

【0019】本発明の固体支持体に載せることができのオリゴヌクレオチドまたはDNA断片（プローブ）については、1本鎖又は2本鎖のDNA、RNA断片等、塩基数にも特に制限はない。オリゴヌクレオチドまたはDNA断片の固定は、固体支持体の表面への化学結合等により行うことができる。例えば、炭化物の表面処理層を形成させた固体支持体を用いる場合、表面を活性化、すなわちDNAと化学結合しやすくした後に、DNAの末端塩基のアミノ基を結合することができる。

【0020】この場合の表面処理層を形成した固体支持体の化学修飾あるいは活性化の一例を挙げると、該固体支持体を塩素ガス中で固体支持体に紫外線照射して炭化物の炭素を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化した後、適当な酸クロリドを用いてカルボキシル化し、末端のカルボキシル基を脱水縮合剤であるカルボジイミド或いはジシクロヘキシルカルボジイミド、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]3-エチルカルボジイミドを用いて、N-ヒドロキシスルシンイミドと脱水縮合することにより、アミド結合を介して炭化水素基の末端にN-ヒドロキシスルシンイミドエステル基等の活性エステル基が結合した基を固定化することができ、活性化される。

【0021】こうして本発明の固体支持体表面を活性化させておけば、例えば、塩基配列が既に解明されている数万本のDNA断片（プローブ）を担持させることができ。また、該固体支持体上にオリゴdTプライマーを結合させておき、逆転写反応等で目的のcDNAを伸張させると同時に固体支持体に結合することもできる。さらに、PCR等を用いて固体支持体上で多数のDNA鎖を伸張させ、かつ結合させることもできる。

【0022】このようにして、DNA断片を結合させた

(4)

特開2003-14747

5

後、これに蛍光標識したDNAサンプルを流すと、DNAサンプルは、該固体支持体上に結合させたDNA断片（プローブ）のうちの相補的な配列を有するプローブとハイブリダイズするので、蛍光スポットとしてDNAサンプルの配列を解明することができる。

【0023】このように、本発明の固体支持体は、あるDNAの塩基配列を従来と同様の方法をそのまま使いながら従来よりも格段に明瞭に解析、特定することができることから、生体ゲノムの解析、遺伝子発現のモニタリング、ゲノムミスマッチング等の遺伝子解析等に利用されるほか、さらにガン遺伝子の突然変異の検出等遺伝子診断や医薬品の開発等に有用である。

【0024】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに説明する。

（実施例1）

（1）以下のようにして、遺伝子解析用に用いるための固体支持体としてポリエチレンテレフタレート樹脂を用意した。まず、ポリエチレンテレフタレート樹脂は、25mm（幅）×75mm（長さ）×1mm（厚み）のものを用いた。次いでポリエチレンテレフタレート樹脂の表面に、ターゲットとして、炭化ハフニウム、炭化ニオブ、炭化珪素、炭化タンタル、炭化チタン、炭化タンクステン、炭化ジルコニウムを用い、アルゴンガスを作動ガスとして高周波スパッタ法により、それぞれのターゲットの炭化物からなる被膜をそれぞれ約10nmの厚みに形成した固体支持体を作成した。

【0025】（2）次に、これらの固体支持体表面を化学修飾し、活性化させた。すなわち、ポリエチレンテレフタレート樹脂の表面を1分間塩素化した後、10分間アミノ化し、さらにコハク酸クロリド溶液へ10分間直接浸漬した。次に、超純水で洗浄後、活性化液へ浸漬して直接活性化を行った。活性化液の組成は、1.4-ジオキサン1mL、ハイドロゲンシアナミド2.5mMおよびN-ヒドロキシスルシンイミド150mMであり、これらを溶解したものである。さらに超純水で洗浄後、65°Cで乾燥して活性化した。

【0026】前記のようにして作成した固体支持体表面に、500pmol/mL濃度のFAMdA17溶液2μLを滴下した（スポット）。この際、バッファーとして超純水あるいは10%ホルムアルデヒド、10%グリセリン、5%DMSOを用いた。次に、インキュベーションを行った。条件は、水/ホルムアミド=1/1寡糖中65°Cで1時間とした（乾燥）。

【0027】こうして得られた遺伝子解析用として用いる固体支持体につき、蛍光強度を測定した。測定時間は1分とし、装置はLAS-1000P1usを用いて、スポット後および乾燥（65°C）後の蛍光強度を測定したが、いずれも従来用いられている固体支持体よりも優れた値であった。

(4)

6

【0028】本発明の固体支持体は、いずれもスポット後および乾燥後の蛍光強度についても、従来の固体支持体上のスポット後および乾燥後の蛍光強度よりも優れていた。すなわち、本発明の固体支持体は、いずれにおいてもスポットしたDNAあるいは蛋白質等の生体物質断片が洗い流されずに固体支持体上に残留しており、スポットが明瞭に検出できた。

【0029】一方、従来の固体支持体は、スポットしたDNAあるいは蛋白質等の生体物質の断片が洗い流されてしまい、固体支持体上に残留していない、スポットが明瞭に検出できなかった。

【0030】（実施例2）基体として、25mm（幅）×75mm（長さ）×0.5mm（厚み）のシリコンを用いた。このシリコン基体の表面に、ターゲットとして炭化タンタルを用い、アルゴンガスを作動ガスとして高周波スパッタ法により、炭化物からなる皮膜を約10nmの厚みにした。

【0031】次に、このシリコン基体の表面を化学修飾し、活性化させた。シリコン基体表面を塩素ガス中で1分間紫外線照射して塩素化した後、アンモニアガス中で10分間アミノ化し、さらに無水コハク酸溶液に20分間浸漬した。無水コハク酸溶液は、N-メチル-2-ピロリドンに無水コハク酸を140mM/L、ホウ酸ナトリウム（pH 8）を0.1M/Lを溶解させて作成した。

【0032】次に、活性化液に浸漬して直接活性化を行った。活性化液は、200mL入りのビーカーに、N-ヒドロキシスルシンイミドを115mgと1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]3-エチルカルボシイミドを959mgをリン酸バッファー（pH 6）50mLに溶解し、これにシリコン基体を浸漬して反応させ、洗浄した。次に、活性化した基板にDNAをスポットティングした。DNAサンプルを濃度が0.3μg/μLになるように5%DMSO溶液（スポットティングバッファー）に溶解してスポットティング用溶液を準備した。次に、スポットティング装置を用いて、スライドグラスにDNA溶液を押しつけた。このようにして、スライドグラス表面にDNAサンプルを多数貼り付けた。

【0033】次に、DNA固定化のためにインキュベーションを行った。まず、水とホルムアルデヒドを1:1に混合した溶液をタイトボックスに入れ、調温チャンバーとした。次に、溶液に触れないようにシリコン基体を調温チャンバーに入れ、3時間放置した。その後、洗浄液（2×SSC、0.2%SDS）で2度洗浄し、更に、0.1%SSCと滅菌水でリーンスし、遠心乾燥した。

【0034】次に、ブレハイブリダイゼーション溶液（5%ホルムアミド、5×デンハルト液）でブロッキングした。ブロッキング溶液を基板に滴下し、気泡が入り込まないようにカバーガラスを静かにのせた。その

(5)

特開2003-14747

7

後、基板を調温チャンバーに入れ、60°Cで1時間プロッキングを行った。その後、0.1×SSCでカバーガラスを洗い落とし、滅菌水で15分間洗浄してから遠心乾燥した。

【0035】それから、DNAサンプルを蛍光標識ラベルキットで蛍光標識した後、標準化したDNAをアルカリ変性した。標識ラベルをハイブリダイゼーションバッファー（20%SSC、20%ホルムアミド、0.5%SDS）に溶解して0.3μg/mlに調整し、ハイブリダイゼーション溶液とした。DNAを固定したシリコン基板を熱水に5分間浸漬した後、ハイブリダイゼーション溶液を基板に滴下し、気泡が入り込まないようにカバーガラスを静かに載せた。その後、調温チャンバー中で12時間ハイブリダイゼーションした。

【0036】その後、0.1×SSCでカバーガラスを洗い落とし、洗浄液（2×SSC、0.2%SDS）で2度洗浄し、更に0.1%SSCと滅菌水でリンスして*

8

*から遠心乾燥した。こうして得られた基板を、富士写真フィルム製フルオロイメージアナライザーフLA-8000で観察を行った。本発明の蛍光強度は、1352であり、従来の845より高かった。

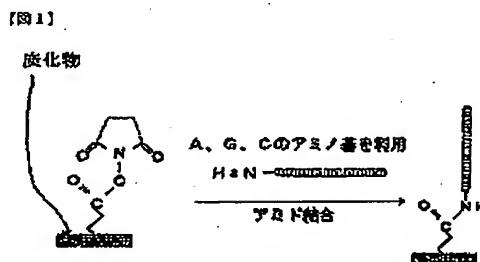
【0037】

【発明の効果】本発明の固体支持体は、あるDNAの塩基配列を従来と同様の方法をそのまま使いながら従来よりも段階的に明瞭に解析、特定することができるから、生体ゲノムの解析、遺伝子発現のモニタリング、ゲノムミスマッチング等の遺伝子あるいは蛋白質等の生体物質の解析等に利用されるほか、さらにガン遺伝子の突然変異の検出等遺伝子診断や医薬品の開発等に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の固体支持体上にプローブを固定化する場合の概略説明図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 岡村 滋
山口県下松市東益井1296番地の1 東洋綱
錬株式会社技術研究所内

(72)発明者 江原 啓悟
山口県下松市東益井1296番地の1 東洋綱
錬株式会社技術研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA01 CA09 HA12
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 CC07
FA15